

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Peternakan dan Laboratorium Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang pada tanggal 31 September – 12 November 2016.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini adalah:

- **Peralatan Pengambilan Sperma**

Tabel 1. Peralatan pengambilan sperma

No	Alat	Fungsi
1	Sectio set	Membedah induk ikan papuyu untuk mengambil sperma
2	Lap basah	Menutup mata ikan dan sebagian tubuhnya agar mudah memegang serta tidak banyak bergerak
3	Sarung tangan bedah	Menjaga kebersihan tangan
4	Bak pemeliharaan induk	Menyimpan induk selama penelitian
5	Ember	Mengambil induk dan memindahkan ke tempat bedah

- **Peralatan pembuatan larutan pengencer**

Tabel 2. Peralatan pembuatan larutan pengencer

No	Alat	Fungsi
1	Spuir 50 ml	Mengambil dan memindahkan cairan dalam volume dibawah 50 ml
2	Spuir 1 ml	Mengambil dan memindahkan cairan dalam volume dibawah 1 ml
3	Pipet tetes	Mengambil larutan tertentu yang dibutuhkan dalam jumlah tertentu.
4	Erlenmeyer 50 ml	Sebagai tempat cairan untuk pengencer

- **Peralatan pemeriksaan motilitas dan viabilitas sperma**

Tabel 3. Peralatan pemeriksaan motilitas dan viabilitas sperma

No	Alat	Fungsi
1	Mikroskop	Memperbesar pengamatan sperma
2	Haemocytometer	Sebagai objek glass yang dilengkapi dengan garis-garis skala didalamnya yang memudahkan dalam menghitung keberadaan sperma
3	Obyek glass	Meletakkan bahan (spermatozoa) yang akan diamati dibawah mikroskop
4	Cover glass	Menutup bahan pengamatan yang akan diamati dibawah mikroskop
5	Hand tally counter	Menghitung jumlah sel spermatozoa yang

No	Alat	Fungsi
		hidup dan mati pada pengamatan
6	Mikrotub	Wadah sampel
7	Stop watch	Menghitung waktu yang digunakan pada proses tertentu
8	Kertas tissue	Mengeringkan peralatan dan lubang urogenital induk Ikan Mas sebelum stripping
9	Sprit 1 ml	Mengambil dan memindahkan sampel

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan selama penelitian adalah :

- a) Induk ikan papuyu jantan 30 ekor
- b) Madu bunga pohon karet
- c) NaCl fisiologis
- d) Aluminium foil
- e) Sprit
- f) Label perlakuan
- g) Sperma (sesuai perlakuan)
- h) Tisu
- i) Kertas lakmus

3.3 Batasan Variabel

- a) Madu adalah cairan alami yang umumnya mempunyai rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga tanaman (floral nektar) atau

bagian lain dari tanaman (ekstra floral nektar) atau ekskresi serangga. (SNI 01-3545-2004)

- b) Viabilitas adalah kemampuan hidup spermatozoa (Burhani dan Lawrens, 2002)
- c) Motilitas adalah daya gerak atau prosentase gerak dari spermatozoa (Tang dan Affandi, 2000 *dalam* Abdan, 2005)
- d) Masa Penyimpanan adalah kegiatan penyimpanan sperma dalam waktu tertentu (Hoar *et al.* 1971)

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Hanafiah (2014) percobaan atau eksperimen adalah suatu tindakan coba-coba (trial) yang dirancang untuk menguji keabsahan (*Validity*) dari hipotesis yang diajukan. Percobaan merupakan suatu alat penelitian yang digunakan untuk menyelidiki sesuatu yang belum diketahui atau untuk menguji suatu teori (*principle*) atau hipotesis. Percobaan ini merupakan suatu taraf kritis dalam metode ilmiah, karena pada taraf inilah pertanyaan-pertanyaan yang mendasari suatu program diselidiki untuk dijawab atas dasar penerimaan atau penolakan hipotesis yang diajukan.

3.4.2 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Hanafiah (2014) Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan-rancangan lainnya. Dalam rancangan ini tidak terdapat lokal

kontrol sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat. Oleh karena itu, RAL umumnya cocok digunakan untuk kondisi lingkungan, alat, bahan, dan media yang homogen. Adapun model matematika yang digunakan yaitu :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \Sigma_{ij}$$

Keterangan : Y_{ij} = Respon terhadap perlakuan ke-i pada ulangan ke-j

μ = Nilai tengah respons

α_i = Pengaruh perlakuan ke-i yang akan diuji

Σ_{ij} = Pengaruh acak dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

3.4.3 Perlakuan Percobaan

Perlakuan pada larutan pengencer dibuat dengan cara menggunakan madu yang dilarutkan dalam NaCl Fisiologis. Campuran madu dan NaCl fisiologis selanjutnya akan disebut sebagai Larutan Pengencer. Variasi larutan pengencer yang sebelumnya telah digunakan oleh Rahardhianto, dkk (2012) dalam penelitian yang berjudul “Pengaruh konsentrasi larutan madu dalam NaCl fisiologi terhadap viabilitas dan motilitas spermatozoa ikan patin (*pangasius pangasius*) selama masa penyimpanan” yaitu dari 0,2%, 0,4%, 0,6% dan 0,8%. Konsentrasi larutan pengencer dalam satuan % setara dengan ml/100ml. Hasil penelitian Rahardhianto (2012) juga menyebutkan bahwa persentase motilitas spermatozoa ikan patin paling baik terdapat pada larutan pengencer D3 (99,4 ml larutan NaCl fisiologis dan madu 0,6 ml dan larutan pengencer D2 (99,6 ml larutan NaCl fisiologi dan madu 0,4 ml) pada pengamatan T1 (6 jam). Dan persentase viabilitas spermatozoa ikan patin paling baik terdapat pada larutan pengencer D3 (99,4 ml larutan NaCl

fisiologis dan madu 0,6 ml) dan D4 (99,2 ml larutan NaCl dan madu 0,8 ml) pada pengamatan T1 (6 jam).

Karena berdasarkan penelitian sebelumnya penambahan konsentrasi madu 0,6% merupakan yang terbaik, maka pada penelitian kali ini penambahan konsentrasi madu 0,6% akan digunakan sebagai patokan pada variasi larutan pengencer yang akan digunakan. Adapun variasi larutan pengencer yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu

P_0 = kontrol (sperma 0,05 ml + 0 ml madu dalam 0,45 ml NaCl Fisiologis)

P_1 = 0,3 % larutan (sperma 0,05 ml + 0,001 ml madu dalam 0,449 ml NaCl Fisiologis)

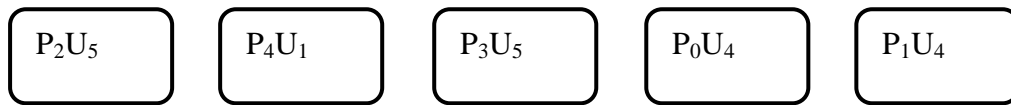
P_2 = 0,6 % larutan (sperma 0,05 ml + 0,003 ml madu dalam 0,447 ml NaCl Fisiologis)

P_3 = 0,9 % larutan (sperma 0,05 ml + 0,004 ml madu dalam 0,446 ml NaCl Fisiologis)

P_4 = 1,2 % larutan (sperma 0,05 ml + 0,005 ml madu dalam 0,445 ml NaCl Fisiologis)

Dari 4 perlakuan dan 1 kontrol diatas, kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Adapun denah penelitiannya yaitu:

P_1U_2	P_3U_1	P_4U_2	P_0U_5	P_2U_3
P_2U_2	P_1U_1	P_3U_4	P_4U_3	P_0U_2
P_0U_3	P_2U_4	P_1U_5	P_4U_4	P_3U_2
P_4U_5	P_0U_1	P_1U_3	P_3U_3	P_2U_1



Gambar 2. Denah Penelitian

Keterangan : P = Perlakuan (treatment)

U = Ulangan (replikasi)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

Tahap persiapan dalam penelitian ini meliputi persiapan peralatan, pembuatan larutan pengencer, dan pengambilan sperma.

A. Pembuatan Larutan Pengencer

- a) Menyiapkan alat berupa apendorn, erlenmeyer, spuit 50 ml dan spuit 1 ml, kemudian bahan berupa madu karet dan NaCl fisiologis.
- b) Mengambil madu karet dan NaCl fisiologis sesuai konsentrasi pada tiap-tiap perlakuan menggunakan spuit. Angka konsentrasi larutan pengencer (madu dan NaCl) setiap perlakuan dikalikan 100 untuk memudahkan pengaplikasian menjadi :

P_0 = madu 0 ml & NaCl 45 ml (kontrol):

P_1 = madu 0,1 ml & NaCl 44,9 ml (0,3%);

P_2 = madu 0,3 ml & NaCl 44,7 ml (0,6%);

P_3 = madu 0,4 ml & NaCl 44,6 ml (0,9%);

P_4 = madu 0,5 ml & NaCl 44,5 ml (1,2%)

- c) Memasukkan madu karet dan NaCl fisiologis pada erlenmeyer yang terbagi atas seluruh perlakuan

- d) Menghomogenkan madu karet dan NaCl fisiologis.
- e) Memberi label perlakuan berdasarkan jumlah konsentrasi madu dan NaCl fisiologis
- f) Meletakkan erlenmeyer pada tempat larutan pengencer yang siap digunakan.

B. Pengambilan Sperma

- a) Induk ikan papuyu jantan dipilih yang telah matang gonad
- b) Membedah induk ikan papuyu untuk mengambil gonad sperma

3.5.2 Tahap Pelaksanaan

A. Pencampuran Larutan Pengencer dengan Sperma

- a) Menyiapkan larutan pengencer dan sperma
- b) Mengambil sperma sebanyak 0,5 ml dengan spuit
- c) Memasukkan kedalam apendorf yang telah berisikan larutan pengencer dengan konsentrasi madu sesuai perlakuan
- d) Menutup apendorf

B. Penyimpanan

- a) Memberi label sebagai tanda perlakuan pada apendorf
- b) Menentukan lokasi penyimpanan yang aman, tidak terkena matahari langsung sehingga tetap dalam kondisi suhu ruang
- c) Menaruh dan menyusun penempatan apendorf sesuai denah penelitian

C. Pengamatan Motilitas dan Viabilitas Sperma

Pengamatan ini dilakukan sebanyak 2 kali pada durasi penyimpanan 2 jam dan durasi penyimpanan 4 jam. Adapun tahapan dari pengamatan motilitas dan viabilitas sperma yaitu:

a) Pengenceran sampel yang konsentrasinya $\frac{1}{10}$ atau 10^{-1} dirubah menjadi

$\frac{1}{100.000}$ atau 10^{-5} agar memudahkan penghitungan pada saat

pengamatan melalui mikroskop.

b) Pengamatan Motilitas

- Menyiapkan alat berupa haemocytometer, cover glass, hand tally counter dan mikroskop.
- Meneteskan sperma diatas haemocytometer yang telah diencerkan.
- Menutup sperma dengan cover glass.
- Menghitung sperma yang melakukan pergerakan dengan hand tally counter melalui mikroskop.
- Mencatat hasil yang didapatkan.

c) Pengamatan Viabilitas

- Menyiapkan alat berupa haemocytometer, cover glass, hand tally counter dan mikroskop.
- Meneteskan sampel diatas haemocytometer yang telah diencerkan.
- Menutup sperma dengan cover glass.
- Menghitung sperma yang masih hidup dengan hand tally counter melalui mikroskop.
- Mencatat hasil yang didapatkan.

3.5.3 Parameter Pengamatan

A. Parameter Utama

1) Viabilitas

Viabilitas sperma dihitung berdasarkan spermatozoa yang hidup didalam penelitian dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Viabilitas spermatozoa} = \frac{X}{100} \times 100\%$$

Keterangan: X = sel sperma yang hidup

100 = jumlah sperma yang diamati (Abdan, 2005)

2) Motilitas

Motilitas spermatozoa ikan papuyu ditentukan dari banyaknya jumlah spermatozoa yang bergerak dari suatu lapang pandang. Dalam penelitian ini kategori pergerakan spermatozoa diabaikan, artinya semua jenis kategori pergerakan spermatozoa pada saat pengamatan dihitung dan dipersentasekan. Konsentrasi sperma diukur menggunakan Haemocytometer. Jumlah sperma per petak dihitung secara manual untuk mendapatkan hasil yang tepat dan akurat.

B. Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah derajat keasaman (pH) pada sperma yang diukur dengan kertas lakmus.

3.5.4 Waktu dan Frekuensi Pengamatan

Pengamatan sperma dilakukan sebanyak 2 kali yaitu pada:

- 2 jam penyimpanan
- 4 jam penyimpanan

3.6 Metode Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan uji *One Way ANOVA*. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, maka akan dilakukan uji *Least Significance Different* (LSD) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar tiap individu perlakuan. Selain itu juga dilakukan uji normalitas untuk melihat data berdistribusi normal atau tidak.

